

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山下 由美子

セレンは人体においては必須微量元素で食品から摂取され、生体抗酸化反応で重要な役割を担っている。魚介類では、メチル水銀を添加したビンナガ肉の動物投与試験によって、魚肉中の有機態セレンがメチル水銀に対する毒性軽減作用を有することが明らかにされたが、有機態セレンの化学的性状、栄養学的意義、などについては不明のまま残されてきた。そこで本研究は、マグロ類から低分子量の有機態セレンを単離し、新規セレン含有イミダゾール化合物セレノネインを同定するとともに、セレンタンパク質のグルタチオンペルオキシターゼ (GPx) を精製し、その性状を明らかにした。

まず、クロマグロ血液から各種クロマトグラフィーによってセレン含有低分子化合物を精製した。本化合物は MS/MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR などの解析から 2-selenyl- $N_\alpha, N_\alpha, N_\alpha$ -trimethyl-L-histidine [3-(2-hydroroseleno-1*H*-imidazol-5-yl)-2-(trimethylammonio)propanoate] の酸化型二量体と同定され、10 mM 還元型グルタチオン存在下、ESI-MS 解析で、生体内濃度の還元条件下で単量体に解離することが明らかになった。セレノネインと命名したこの新規化合物の還元型の DPPH に対するラジカル 50% 消去濃度 (RS₅₀ 値) は 1.9 μM と、水溶性ビタミン E 誘導体 Trolox[®] (RS₅₀=880) およびエルゴチオネイン

(RS₅₀=1700) と比べて著しく高かった。セレノネイン酸化型二量体は、ヒト臍帯由来血管内皮細胞内に速やかに取り込まれ、増殖促進作用を示すと同時に、過酸化水素による酸化ストレスに対して耐性を示した。また、ウサギ赤血球への投与によって活性酸素種 (ROS) の生成が抑制され、ヘモグロビンのメト化が抑制された。さらに、ブリ活魚に静脈投与したところ (Se として 12 nmol/kg, 対照区は純水を投与)、投与 18 時間後の赤血球セレノネイン含量および血漿 GPx 含量は上昇した。また、ROS の生成およびミオグロビンのメト化が抑制され、刺身状のスライスを 4°C で一晩保存しても赤みが保持された。

次に、GPC カラムの溶離液を ICP-MS に導入して ^{82}Se を測定したところ、魚類普通筋中ではメカジキ 2.8 nmol/g, メバチ 2.6 nmol/g, クロマグロ 2.4 nmol/g, ビンナガ 1.7 nmol/g およびキハダ 1.6 nmol/g であった。一方、キンメダイ, マイワシ, アオメエソ, カツオ, マサバ, マアジ, マダイ, ヤマトカマス, マアナゴ, カタクチイワシ, サケ, サンマ, イシモチおよびマコガレイ筋肉では 1.4 nmol/g 以下であった。さらに、魚肉中の別途測定した総水銀含量に対する総セレン含量のモル比は、1 (メカジキ) ~ 217 (マコガレイ) と、肉食性の強い高次捕食魚に低いことが明らかとなった。

さらに、アンチセンスモルフォリノオリゴを用いてトランスポーター OCTN1 の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚では、赤血球へのセレノネインの取り込みが抑制された。OCTN1 によるセレノネインの取り込みに対する Km 値は、ゼブラフィッシュ赤血球では 9.5 μM , ヒト腎臓由来 HEK293 細胞では 13.0 μM で、セレノネインは OCTN1 に対する特異的な基質であることが明らかとなった。次に、ゼブラフィッシュ胚へのメチル水銀システ

イン投与によって発生異常が生じたが、セレノネインをメチル水銀システインと同時に投与したところ、胚における水銀含量が低下し、無機水銀が生成した。さらに、OCTN1の発現抑制によって、ゼブラフィッシュ胚における水銀蓄積が促進され、セレノネインとメチル水銀の複合体がセレノネインの特異的トランスポーターを介して細胞外、体外に排出されることが推定された。

次に、クロマグロ血合筋からGPxを精製した。精製GPxの分子量はゲルろ過では約90000、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動では約22000と、生理的条件下では四量体を形成していることが明らかになった。本酵素は過酸化水素および有機ヒドロペルオキシドに対して活性を示すとともに、幅広い基質特異性を示した。酵素活性の至適pHは7.4で、過酸化水素に対する K_m 値は6.7 μM であった。次に、クロマグロ筋肉から189および188残基のアミノ酸をコードする、それぞれGPx1aおよびGPx1bの2種類のcDNAを得たが、いずれもセレノシステイン残基をコードするTGAコドンを含んでいた。演繹アミノ酸配列を基にした分子系統樹で、クロマグロGPx1aおよびGPx1bはそれぞれ、既報のゼブラフィッシュGPx1aおよびGPx1bと同じグループを形成した。さらに、ゼブラフィッシュ胚由来ZE培養細胞、ニジマス生殖腺由来RTG2細胞、ブリ由来YT細胞およびヒト腎臓由来HEK293細胞にセレノネインを投与し、細胞抽出液をウェスタンブロッティングに供したところ、GPx1の発現誘導が示された。また、ブリ由来YT細胞およびブリ幼魚へのセレノネイン投与によって、GPx1転写産物量の増大が認められた。

以上、本研究により、魚類から初めて有機態セレンが単離され、新規セレン含有イミダゾール化合物のセレノネインが同定された。セレノネインは魚類、とくにマグロ類に多く含まれ、生体抗酸化作用およびメチル水銀の解毒を担う有機セレン化合物であることが明らかになった。また、セレノネインは、強いラジカル消去活性、ヘムタンパク質の自動酸化抑制作用およびGPx1の発現誘導能を示すことを明らかにしたもので、これらの成果は学術上、応用上資するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。